

4/5/1

DIALOG(R)File 352:Derwent WPI

(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

009671693

WPI Acc No: 1993-365245/199346

XRAM Acc No: C93-161937

New polypeptide contg. heparin-binding domain - has intercellular adhesion activity and cancer metastasis inhibiting activity

Patent Assignee: TAKARA SHUZO CO LTD (TAKI )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 5271291	A	19931019	JP 91238935	A	19910827	199346 B
JP 2729712	B2	19980318	JP 91238935	A	19910827	199816

Priority Applications (No Type Date): JP 91117886 A 19910423

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

JP 5271291 A 13 C07K-013/00

JP 2729712 B2 20 C07K-014/78 Previous Publ. patent JP 5271291

Abstract (Basic): JP 5271291 A

A functional polypeptide of the formula A-(B)m-(C)n (I); A = 278 amino acid polypeptide Seg. No. 1); B = polypeptide

Asn-Val-Ser-Pro-Pro-Arg-Ala- Arg-Val-Thr-Asp-Ala-Thr-Glu-  
 Thr-Thr-Ile-Thr-Ile-Ser-Trp -Arg- Thr-Lys-Thr-Glu-Thr-Ile-Thr  
 -Gly-Phe-Gln-Val-Asp-Ala-Val-Pro Ala-Ans-Gly-Gln-Thr-Ile-Gln  
 -Arg-Thr-Ile-Lys-Pro-Asp-Val -Arg-Ser-Tyr-Thr-Ile-Thr-Gly  
 -Leu-Gln-Pro-Gly-Thr-Asp-Tyr-Lys- Ile-Tyr-Leu-Tyr-Thr-Leu-Asn  
 -Asp-Asn-Ala-Arg-Ser-Ser-Pro-Val- Val-Ile-Asp-Ala-Ser-Thr.

C = polypeptide Ala-Ile-Asp -Ala-Pro-Ser-Asn-Leu-  
 Arg-Phe-Leu-Ala-Thr-Thr-Pro -Asn-Ser-Leu-Leu-Val-Ser-Trp-Gln-  
 Pro-Pro-Arg-Ala-Arg-Ile-Thr -Gly-Tyr-Ile-Ile-Lys-Tyr-Glu-Lys  
 -Pro-Gly-Ser-Pro-Pro-Arg-Glu -Val-Val-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Gly  
 -Val-Thr-Glu-Ala-Thr-Ile-Thr -Gly-Leu-Glu-Pro-Gly-Thr-Glu-Tyr  
 -Thr-Ile-Tyr-Val-Ile-Ala-Leu -Lys-Asn-Asn-Gln-Lys-Ser-Glu-Pro-  
 Leu-Ile-Gly-Arg-Lys-Lys-Thr.

m + n = 1 or 2 and a cancer metastasis inhibitor contg. the above functional polypeptide.

USE/ADVANTAGE - The new low molecular polypeptide has both intercellular adhesion activity and cancer metastasis inhibiting activity. In an example, Heparin-combining domain from E coli HB101/pHD101 was introduced to E coli BW313. A double-stranded DNA was derived and digested by NcoI-BamHI to give 0.54 kb band. It was ligated with NcoI-BamHI fragment of plasmid pTF7520 and introduced to E coli HB101. A plasmid was extracted from it and named pCHU179. III-12 and III-14 of H-271 was deleted from it to give pCHV89. pCHV90 was also prepd. Their intercellular adhesion activities, heparin-combining activities and reactivities with monoclonal antibody against heparin-combined domain were determined. Their doses inhibited lung metastasis of melanoma in mouse.

Dwg.0/0

Title Terms: NEW; POLYPEPTIDE; CONTAIN; HEPARIN; BIND; DOMAIN; ADHESIVE; ACTIVE; CANCER; METASTASIS; INHIBIT; ACTIVE

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C07K-013/00; C07K-014/78

International Patent Class (Additional): A61K-037/02; A61K-038/00;

C12N-001/21; C12N-015/09; C12N-015/62; C12N-015/70; C12P-021/02;

C12R-001-19

File Segment: CPI

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2729712号

(45) 発行日 平成10年(1998) 3月18日

(24) 登録日 平成9年(1997)12月19日

(51) Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	片内整理番号	P I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/78	Z N A		C 0 7 K 14/78	Z N A
A 6 1 K 38/00	A D T		C 1 2 N 1/21	
	A D U		C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 1/21			A 6 1 K 37/02	A D U
15/00				A D T

請求項の数 6 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平3-239935	(73) 特許権者	591038141 貴陽造機株式会社 京都府京都市伏見区竹中町600番地
(22) 出願日	平成3年(1991) 8月27日	(72) 発明者	東 市郎 北海道札幌市南区真砂内上町5丁目3番2号
(65) 公開番号	特開平5-271291	(72) 発明者	鈴木 育夫 北海道札幌市厚別区厚別北3条5丁目12-6
(43) 公開日	平成5年(1993)10月19日	(72) 発明者	田口 由紀 鹿児島大津市瀬田3丁目4番1号 貴陽造機株式会社中央研究所内
(31) 優先権主張番号	特願平3-117856	(74) 代理人	弁理士 中本 宏 (外2名)
(32) 優先日	平3(1991) 4月23日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
微生物の受託番号	F E R M P-12182		
微生物の受託番号	F E R M P-12183		
微生物の受託番号	F E R M B P-1941		
微生物の受託番号	F E R M B P-2264		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 機能性ポリペプチド

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式(化1)：

【化1】 A-(B)<sub>n</sub>-(C)。

(式中Aは配列表の配列番号1で表されるポリペプチド、Bは配列表の配列番号2で表されるポリペプチド、Cは配列表の配列番号3で表されるポリペプチド、m、nはそれぞれ1又は0の数を示す。但しm、nの和は1以上である)で表されることを特徴とする機能性ポリペプチド。

【請求項2】 請求項1記載の機能性ポリペプチドを含む10有することを特徴とするがん転移抑制剤。

【請求項3】 請求項1記載の機能性ポリペプチドをコードする核酸。

【請求項4】 請求項1記載の機能性ポリペプチドをコードするDNAを遺伝子としたプラスミド。

2

【請求項5】 請求項4記載のプラスミドを導入した形質転換体。

【請求項6】 請求項5記載の形質転換体を培養し、該培養物より請求項1記載の機能性ポリペプチドを採取することを特徴とする機能性ポリペプチドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規ポリペプチドに関し、更に詳しくは細胞接着活性とがん転移抑制活性の両活性を有する新規なポリペプチド、並びにそれらをコードする核酸、及びそのDNAを用いた該ペプチドの遺伝子工学的な製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 フィブロネクチン(以下、FNと表示する)は、血管や細胞外マトリックスに存在する糖タンパク

特許2729712

(2)

3

く要で、多彩な機能を持つことが知られている〔ニュ  
アルレビュー オブ バイオケミストリー(Annual Re  
view of Biochemistry)、第57巻、第375~413  
頁(1988)〕。天然のFNを創傷治癒、点眼薬等の  
医薬品や化粧品に利用する試みがなされているが、血液  
から採取するため、供給に制限があること、コスト高  
であること、また、病原性の細菌やウイルス等による汚  
染の可能性があること等の理由により、実用化されてい  
ない。FNにはヘパリンに結合する領域(ヘパリン結合  
ドメイン)が2つ所存し、1ヶ所はN末端付近にあり、  
結合にCa<sup>2+</sup>イオンが必要であることが知られてい  
る。もう一方の領域はC末端付近にあり、この領域のヘ  
パリンに対する結合活性は、前述の領域よりも強く、し  
かもCa<sup>2+</sup>イオンに影響されない。最近の研究からFNの  
ヘパリン結合ドメインが、細胞接着ドメインと同様に銀  
歯芽細胞、内皮細胞、ある種のガン細胞等の接着、伸  
展、移動に重要な役割を果たしていることが次第に明ら  
かとなった。FNのヘパリン結合ドメインは細胞の表  
面にあるプロテオグリカンに結合して、細胞と細胞外マ  
トリックスとの相互作用を引き起こすことにより、細胞の接  
着、伸張、移動等に寄与すると考えられる。したがっ  
て、細胞接着ドメイン構造とヘパリン結合ドメイン構造  
の両構造を持つポリペプチドは、細胞と細胞外マ  
トリックスの両方に結合して創傷部の組織の修復や、恒常性の  
維持に寄与し、医薬品としての用途が期待できる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは特開平2  
-311498号公報に記載のヒTFNの細胞接着ド  
メイン、ヘパリン結合ドメインが、直接又はリンカーペ  
プチドを介して結合した機能性ポリペプチドを創製し、  
該ポリペプチドがガン転移抑制作用等の生理活性を示す  
ことを既に見出している(特開平3-127742号、  
特願平1-306145号、同2-165727号各明  
細書)。ガン転移抑制作用、脈管形成抑制作用等の生理  
活性は、機能性ポリペプチドの構造、特に該ポリペプ  
チドのヘパリン結合ドメイン由来のポリペプチドの構造に  
より異なることより、更にヘパリン結合ドメイン由来の  
ポリペプチド部の構造の異なる上記機能性ポリペプチド  
の開発が望まれている。本発明の目的は上記現状に堪  
が、ヘパリン結合ドメイン由来のポリペプチド部の構  
造の異なる細胞接着活性とガン転移抑制活性を合せもつ  
機能性ポリペプチド、及び該ポリペプチドを含有するガ  
ン転移抑制剤を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明を概説すれば、本  
発明の第1の発明は機能性ポリペプチドに関し、下記一  
般式(1)：

【化1】A-(B)<sub>n</sub>-C(1)。

(式中Aは配列表の配列番号1で表されるポリペプ

チド、Bは配列表の配列番号2で表されるポリペプチド、

4

Cは配列表の配列番号3で表されるポリペプチド、m、  
nはそれぞれ1又は0の数を示す。但しm、nの和は1  
以上である)で表されることを特徴とする。また本発明  
の第2の発明はガン転移抑制剤に関し、本発明の第1の  
発明の機能性ポリペプチドを含有することを特徴とす  
る。本発明の第3の発明は、第1の発明の機能性ポリペ  
プチドをコードする核酸に関する。本発明の第4の発明  
は、第1の発明の機能性ポリペプチドをコードするDN  
Aを組込んだプラスミドに関する。本発明の第5の発明  
は、第4の発明のプラスミドを導入した形質転換体に関  
する。更に本発明の第6の発明は、第1の発明の機能性  
ポリペプチドの製造方法に関し、第5の発明の形質転換  
体を培養し、該培養体より第1の発明の機能性ポリペ  
プチドを採取することを特徴とする。

【0005】配列表の配列番号1のアミノ酸番号1~2  
77はヒTFNの細胞接着ドメインのPro<sup>1</sup>~Ser<sup>277</sup>と同一配列であり、配列表の配列番号2はヒTFN  
のヘパリン結合ドメインのAsn<sup>281</sup>~Thr<sup>398</sup>と同一配  
列であり、配列表の配列番号3は同じくヘパリン結合ド  
メインのAla<sup>401</sup>~Thr<sup>498</sup>と同一配列である。

【0006】なお、本明細書において、アミノ酸に付与  
された肩数字は、EMBLデータバンク(EMBL DATA B  
ANK)のFNのcDNAを翻訳して得られるアミノ酸に  
付与されたN末端からのアミノ酸数を示す。

【0007】ヒTFNの遺伝子構造については、ジ  
ェン  
ボ ジャーナル(The EMBO Journal)、第4巻、第1  
755~1759頁(1985)に記載されている。ま  
た、その細胞接着ドメイン及びヘパリン結合ドメインを  
コードするcDNAクローン(pLF5、pLF3、p  
LF4及びpLF5)についてはバイオケミストリー  
(Biochemistry)、第25巻、第4936~4941頁  
(1986)に記載されている。本発明者らは、pLF  
5から、細胞接着ドメインに対するcDNA断片を取出  
し、これを発覚ベクターに接続して大腸菌に導入する  
ことにより、細胞接着活性ポリペプチド及びその製造方法  
を開発し特許出願した(特開平1-206998号)。  
本発明が必要とされる細胞接着ドメインのcDNAは、  
特開平1-206998号公報に記載されている置換  
体プラスミドpTF702を用いることができる。pTF702  
はFNのPro<sup>1</sup>~Met<sup>277</sup>(279アミノ酸残基)  
を発現するプラスミドである。pTF702の翻訳領域のC末  
端の終止コドンの直前にクロニングサイトの、例えばN  
coIサイトを導入することにより、細胞接着ドメインの  
cDNAと他のドメインのcDNAを連結させることが  
できる。特開平2-311498号公報に記載のように  
pTF702にNcoIサイトを導入したプラスミドはpTF75  
20と命名され、該プラスミド中にPro<sup>1</sup>~Ser<sup>277</sup>~  
Metの配列がコードされている。

【0008】ヘパリン結合ドメインについてはトリプ  
シン、サーモラジン、カテプシンD等によって分解され

(3)

特許2729712

5

で得られた断片が報告されており、その大きさは、29 kbから38 kbに及んでいる。ドメインの詳細な特定はなされていないが、一般的には約90アミノ酸から成る I II型細胞配列を3個く III-12、III-13、III-14)と、それに続く IIIC型配列の一部を含む断片が知られている。

【0009】ヘパリン結合ドメインをコードする cDNA は、pF2435から取出すことができる。pF2435は、前記 pLF2、pLF3、pLF4 及び pLF5 から再構築されたプラスミドで、FN のヘパリン結合ドメインをコードする cDNA を含んでいる。pF2435 から必要な cDNA 断片を制限酵素で切出し、5' 側に開始コドンを含む合成 DNA を、また、3' 側には、終止コドンを含む合成 DNA を DNA リガーゼで連結した後、適当な発現ベクターに接続することにより、特開平2-311498号公報に記載の II型細胞配列が3個つなげた配列を有するペプチド (H-271) を発現するプラスミド pFp0101 を得ることができる。

【0010】プラスミド pFp7520 及びプラスミド pFp0101 については特開平2-311498号公報中に更に詳細に記述されている。CHV-179、CHV-90 及び CHV-89 は、それぞれヘパリン結合ドメインの III型リピートのうち、III-13 及び III-14、III-14、及び III-13 が細胞接着ドメインポリペプチド (Pro<sup>1119</sup>-Ser<sup>1713</sup>) の C 末端にメチオニン残基を介して結合したポリペプチドである。これらが発現するプラスミド F は、例えば次のようにして構築することができる。ヘパリン結合ドメインのポリペプチド (H-271) をコードするプラスミド pFp0101 の III-13 の N 末端、又は C 末端に対応する領域に N<sub>60</sub> I サイトを導入し、N<sub>60</sub> I と B<sub>90</sub> H I で消化して III-14、又は III-13 及び III-14 をコードする DNA 断片を得る。これを細胞接着ドメインポリペプチドをコードしているプラスミド pFp7520 (特開平2-311498号) の N<sub>60</sub> I-B<sub>90</sub> H I サイトに接続することにより、CHV-179 及び CHV-90 をそれぞれ発現するプラスミド pFp179 及び pFp9090 が得られる。次いで、CHV-179 を発現するプラスミドから、部位特異的変異の手法で、III-14 をコードする配列を欠失させることにより、CHV-89 を発現するプラスミド pFp8990 を得ることができる。

【0011】前記プラスミドにおける連結部には、N<sub>60</sub> I サイトに由来するメチオニン残基がリンカーとして含まれている。リンカーの有無は、本発明の効果を左右するものであるが、必要とあれば部位特異的変異の手法により、容易に除去することができる。また、任意のスペーサーを分子間結合の調節のため挿入することもできる。

【0012】配列表の配列番号4のアミノ酸配列をコードするプラスミド pFp489、配列表の配列番号5のアミノ酸配列をコードするプラスミド pFp4179、配列表の配列

6

番号6のアミノ酸配列をコードするプラスミド pFp9090 をそれぞれ例えば、大腸菌に導入し、適当な条件下に培養することにより、目的ペプチドが大腸菌内に蓄積される。発現の確認にはイムノブロットング法が用いられる。組織は大腸菌の全細胞タンパク質を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で分離した後、流動パターンをニトロセルロース膜に移し取る。FN の細胞接着ドメインを認識するモノクローナル抗体 (FN-10、宝薬社) 及び FN のヘパリンドメインを認識するモノクローナル抗体 (IST-1 又は IST-2、セラ・ラブリ社) 等を用いて検出されるバンドが目的のポリペプチドである。目的ポリペプチドの精製は、例えば次のように行う。組織は大腸菌を L-ブロス等の培地に培養し、集菌した後、超音波処理により、菌体破砕液を得、これを遠心分離して上清を得る。上清を透析後、DEAE イオン交換体のカラムで分画し、次いで抗体カラム及び/又はヘパリンアガロース等のアフィニティカラムを行う。以上の操作により、目的のポリペプチドを精製することができる。

【0013】得られたポリペプチドは、BHK 又は NRK 細胞に対する細胞伸張活性の測定及びヘパリン結合活性の測定に用いられる。細胞伸張活性の測定は、例えばロオスタチン (Roostatin) の方法 (メッセンジャー エンザイモロジー (Methods in Enzymology)、第82巻、第803~831頁 (1981)) に準じて行う。すなわち、試料をコートした後、BSA でブロッキングしたマイクロタイプレートに、BHK 又は NRK 細胞の懸濁液を添加し、37°C で約1時間インキュベートした後、未着着の細胞を洗浄した後、ホルマリン固定して、伸張した細胞の割合を顕微鏡下で測定することにより、細胞伸張の強さを測定することができる。一方、ヘパリン結合活性は、ヘパリンを結合した担体、例えば A F-ヘパリントニマル (Toyopearl、東ソー) のカラムに試料を吸着させ、NaCl の塩濃度を上昇させて溶出させ、溶出された塩濃度により、ヘパリンへの結合能力を示すことができる。

【0014】以上の測定により、本発明のポリペプチドは BHK 又は NRK 細胞に対して強い細胞伸張活性を示すと共に、CHV-179、CHV-89 はそれぞれヘパリンに対して強い親和性を示すことが証明される。

【0015】本発明のポリペプチドを医薬品として使用する場合、必要に応じて医薬用担体と共に常法により製剤化し、経口投与又は非経口投与すればよい。製剤化あるいは担体としては薬理学的に許容されるものが選ばれる。その種類及び組成は投与経路や投与方法によって異なる。例えば液状担体として水、アルコール類若しくは大豆油、オリーブ油、ミネラル油等の脂質類、又は合成油が用いられる。固体担体としてはマルトース、ショクロースなどの糖類、アミノ酸類、ヒドロキシプロピルセルロースなどのセルロース誘導体、ステアリン酸アグネ

(4) 特許 2729712

7

シブムなどの有機酸などが使用される。

【0016】注射剤の場合は治療液は生理食塩液、各種糖液、グルコース、イノシトール、マンニトール、ラクトースなどの糖類溶液、エチレングリコール、ポリエチレングリコールなどのグリコール類が望ましい。またイノシトール、マンニトール、ラクトース、シェークロース等の糖類、フェニルアラニン等のアミノ酸等の賦形剤と共に凍結乾燥剤とし、それを投与時に注射用の適当な溶剤、例えば滅菌水、生理食塩液、ブドウ糖液、糖質溶液、アミノ酸溶液等静脈投与用液体に溶解させて投与することもできる。試験中における本発明のポリペプチドの含有量は製剤により異なるが、通常0.1～100重量%好ましくは1～98重量%である。例えば注射液の場合には、通常0.1～30重量%、好ましくは1～10重量%の有効成分を含むようにすることが望ましい。凍結投与する場合には凍結固体担体若しくは液状担体と共に、錠剤、カプセル剤、粉剤、顆粒剤、液剤、ドラインドロップ剤等の形態で用いられる。カプセル、顆粒、粉剤は一般に5～100重量%、好ましくは2.5～98重量%の有効成分を含む。

【0017】投与量は、患者の年齢、体重、症状、治療目的等により決定されるが治療法は一般に、非経口投与で1～100mg/kg/日、経口投与で5～500mg/kg/日である。

【0018】本発明のポリペプチドはB16メラノーマを用いる転移のモデル系にて有意な転移防止効果を示すもので、胃がん、肺がん、大腸がん、乳がん、前立腺がん、子宮頸がん、腎がんなどがん細胞に対して良好に転移を防止して有用な有用なものである。

【0019】以上詳細に説明した様に、遺伝子工学の手法により、細胞接着活性とがん転移抑制活性を併せ持ち、新規な機能性ポリペプチドを効率よく提供することができる。該ポリペプチドは抗転移抑制剤としての用途のほか、腫瘍形成抑制剤、創傷治癒剤、生長促進剤等の医薬品として、また、化粧料、培養基料等として有用である。

【0020】

【実施例】以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。

【0021】実施例1

ヘパリン結合ドメインの一部と細胞接着ドメインポリペプチドとの融合タンパク質の構築  
なお、図1は融合タンパク質を発現するプラスミドの構築工程を示す図である。Escherichia coli HB 101/pMD191 (FERM BP-2264)より調製したヘパリン結合ドメインをコードするプラスミドpH191 (特開平2-311498号)を大腸菌B/W3.13に導入し、ヘルパーファージM13K7を感染させてdIを含む一本鎖DNAを調製した。これをテンプレートとし、NcoI認識配列を含む配列の配列番号6で表す合成DNAをプ

8

ライマーとして、T4 DNAポリメラーゼを作用させ、相補鎖合成を行った。なお、プライマーは、ポリヌクレオチドキナーゼにより、あらかじめ5'末端をリン酸化した。得られた2重鎖DNAを大腸菌DNAリガーゼで環状化し、宿主菌の大腸菌DH5 $\alpha$ -hsmt5株に導入して、複製させた。得られた影響転移体からプラスミドを抽出し、NcoIで切断してゲル電気泳動で約0.27kbのバンドを与えるプラスミドを選択した。このようにして、ヘパリン結合ドメインのIII-13のN末端(Asn<sup>111</sup>)と、III-12のC末端(Glu<sup>178</sup>)をコードする配列の間にNcoIサイトを導入したプラスミドを得た。なお、この変異導入には市販の変異導入キット(ミュータンK、宝酒造)を用いた。このプラスミドを、NcoIとB $\alpha$ HIで消化してゲル電気泳動を行い、約0.54kbのバンドをゲルから抽出した。一方、Escherichia coli JM 109/pTF 7021 (FERM BP-1941)より前述の細胞接着体プラスミドpTF 7021を調製し、次いで該プラスミドにNcoIサイトを導入した。NcoIサイトの導入は特開平2-311498号公報に記載のように、配列表の配列番号7で表すオリゴヌクレオチドを合成し、調製したミュータンKを用いて行い、プラスミドpTF 7520を得た。調製0.54kbのDNA断片をNcoIとB $\alpha$ HIで消化したpTF 7520とT4 DNAリガーゼで連結した後、大腸菌HB 101に導入した。得られた影響転移体から、プラスミドを抽出し、NcoIとB $\alpha$ HIで消化したときに、0.54kbのバンドを与えるプラスミドを選択した。このプラスミドをpGHI79と命名した。pGHI79は、H-271のIII-12を欠失したヘパリン結合ドメインポリペプチドと細胞接着ドメインポリペプチド(Pr<sup>119</sup>-Ser<sup>111</sup>)がメチオニン残基を介して結合した融合タンパク質を発現するプラスミドであることをDNAの電気泳動分析によって確認した。pGHI79を導入した大腸菌HB 101をEscherichia coli HB 101/pGHI79と命名、表示して工業技術院微生物工学技術研究所に寄託した(微生物菌番号12183号(FERM P-12183))。

【0022】同様にして、NcoIサイトを含有配列の配列番号8で表す変異導入プライマーを用いて、pH191に変異導入を行い、III-13のC末端(Thr<sup>119</sup>)と、III-14のN末端(Ala<sup>111</sup>)をコードする配列の間にNcoIサイトを導入したプラスミドを得た。これをNcoIとB $\alpha$ HIで消化して約0.27kbのバンドを切り出し、pTF7520のNcoI-B $\alpha$ HIサイトに接続して、大腸菌HB 101に導入した。得られた影響転移体から、プラスミドを抽出し、NcoIとB $\alpha$ HIで消化したとき、0.27kbのバンドを与えるプラスミドを選択し、このプラスミドをpGHI90と命名した。pGHI90は、H-271のIII-12とIII-13を欠失したヘパリン結合ドメインポリペプチドを細胞接着ドメインポリペプチドがメチオニン残基を介して結合した融合タンパク質

56

を発現するプラスミドであることをDNAの塩基配列分析により確認した。pCMV 90を導入した大腸菌HB101を*Escherichia coli* HB101/pCMV 90と命名した。

【0023】次いで、pCMV179から、III-14をコードする領域を欠失するために欠失導入プライマーとしてIII-13のC末端をコードする配列に相補的な配列と、ストップコドン以下の配列に相補的な配列とを直接結合した配列表の配列番号9で表す30塩基のオリゴヌクレオチドを合成した。これをプライマーとして前記の方法で相補鎖を合成し、DNAリガーゼで繋いだ後、大腸菌DH5α-18mutsを感受性転換し、得られたプラスミドをNcoIとBamHIで消化して、0.27kbの断片を生成するものを目的の変異体として選択した。最終的には、塩基配列分析により、変異を確認した。このようにして得られたプラスミドはH-271のIII-12とI

II-14を欠失したヘパリン結合ドメインポリペプチドと細胞接着ドメインポリペプチドがメチオニン残基を介して結合した融合タンパク質を発現するプラスミドであり、該プラスミドをpCMV89と命名した。これを再び大腸菌HB101に導入して、得られた形質転換体を*Escherichia coli* HB101/pCMV89と命名、表示して工業技術院微生物工学技術研究所に寄託した【微生物菌種寄附12182号（FERM P-12182）】。

【0024】実施例2  
CHV-89、CHV-90、及びCHV-179の大腸菌による生産と精製  
pCMV89を導入した*Escherichia coli* HB101/pCMV89（FERM P-12182）を5.0 μg/mlのアンプシリンを含む5mlのLB-ブロス培地に接種し、37℃、1夜間と培養した。これを5.0 mlの同培地に接種して2と培養し、6.0 mlの吸光度が0.3のときに、2 mlのIPTGを添加して、更に20時間培養した。次に遠心分離により菌体を、1 ml EDTA、5 mlメルカプトエタノール、3 μM p-アミノジフェニルメタンスルホニルフルオリドを含む2.0 mlトリス塩酸バッファー（pH 8.0）に懸濁した。これを超音波処理した後、遠心分離を行って2.5 mlの上清を得た。上清をDEAE-セフトン（50 mM（15 ml）をカラムに吸着させ、カラムを2.0 mlトリス塩酸バッファー（pH 8.0）で洗浄後、バッファー中のNaCl濃度の上昇により吸着物を分離した。イオンクロマトグラフィーにより検出された目的成分を集め、2.0 mlトリス塩酸バッファー（pH 8.0）で平衡化した抗体カラム（FN-10）を結合させたセフトン4B、1.0 ml）に吸着させ、次に0.1 M NaClを含む同バッファー、2.0 ml酢酸アンモニウムの順に洗浄した後、4.0 ml酢酸で目的成分を溶出した。その中でSDS-PAGEで単一のバンドを与える成分を集めて、純度、濃度を調べた。このようにして5.0 mlの培養液から約5 μgのCHV-89

を得た。このCHV-89の一部をプロテインシーケンサー（477A/120A、アプライドバイオシステムズ社）で分析して、N末端配列を確認した。また、カルボキシルペプチダーゼP消化法により、C末端アミノ酸を確認した。

【0025】同様の方法により、pCMV179を導入した*Escherichia coli* HB101/pCMV179（FERM P-12183）を培養し、5.0 mlの培養液から、約5 μgのCHV-179を得た。また、pCMV90を導入した*Escherichia coli* HB101/pCMV90の5.0 ml培養液から約4 μgのCHV-90を得た。CHV-179、CHV-90のN末端アミノ酸、C末端アミノ酸も、上記と同様の方法でそれぞれ確認した。

【0026】実施例3

生物活性の測定

前記実施例2で得られたポリペプチドを用いて細胞接着活性、ヘパリン結合活性及びヘパリン結合ドメインに対するモノクローナル抗体との反応性を測定した。細胞接着活性は、ヒトスライムの方法（メッスインエンザイモロジー、第2巻、図8.3〜8.31頁（1981））に基づいて測定した。試料を蒸留水、PBS（リン酸緩衝生理食塩水）等に溶かし、96穴マイクロプレート上で段階的に希釈した。4℃、2時間インキュベートして、試料をプレート上に吸着させた（5.0 μl/ウェル）。3% BSA（牛血清アルブミン）を含むPBS溶液を100 μl/ウェル加入、37℃、1時間インキュベートしてプレートをブロックした。PBSでプレートを洗浄後、あらかじめダubecco's s)イググロビンA（DMEM）に5×10<sup>5</sup>細胞/mlとなるように懸濁させたベビーハムスター腎細胞（BHK-21）を100 μl/ウェル分注し、37℃、1時間インキュベートした。なお使用したBHK-21細胞は、凍結保存した株を継代培養後、トリプシン処理（37℃、5分）したものをを用いた。PBSでプレートを洗浄後、3%ホルマリン溶液で細胞をプレート上に固定した。顕微鏡下でBHK-21細胞の伸展を観察し、伸展細胞数が、n-FNの高濃度における伸展細胞数の50%となる試料の濃度（ED<sub>50</sub>）を求め細胞接着活性の指標とした。

【0027】ヘパリン結合活性の測定は以下のようにした。2.0 mlのpH 8.0の緩衝液（pH 7.0）で平衡化したA-F-ヘパリン-トビール6.5.0 mlのカラム（1.5 ml）に試料を乗せ、バッファー中のNaCl濃度を段階的に上昇させ、溶出される塩濃度によりヘパリンへの結合力を表した。

【0028】ヘパリン結合ドメインに対するモノクローナル抗体との反応性の測定は、試料1〜2 μgをSDS-PAGEで分離し、これをセミドライブロッター（ザルトリクス社）を用いて、ニトロセルロースメンブランにブロッティングした。メンブランをポロキシゲン液

(6)

特許2729712

11

(1% BSAを含むPBS)で処理した後、FNのヘパリン結合ドメインを認識するモノクローナル抗体 (iS T-1及び2、セラ・ラプ)を含むブロッキング液と約1時間インキュベートし、50 mM NaCl及び0.05% NP-40を含む10 mM トリス・HC1バッファー (pH 7.5)でメンブランを洗浄、更にNP-40を含みない上記バッファーでメンブランを洗浄した。次いで、パーオキシダーゼ標識2次抗体 (アプシム社)を含むブロッキング液と約1時間インキュベートす

表 1

試 料	細胞接着活性 (ED <sub>50</sub> , mM)	ヘパリン結合活性 (溶出量濃度, mM)	抗体との反応性	
			IS-1	IS-2
G <sub>12</sub> -Met-H <sub>22</sub>	176	300	有	有
CHV-179	176	300	有	有
CHV-90	176	150	無	無
CHV-89	176	300	有	有

## 【0031】実施例4

次に本発明のポリペプチドの生理活性を示す。

## (1) ガン転移抑制作用

C57BL/6 マウス (1群5匹) に616-BL6メラノーマ細胞  $3 \times 10^4$  個と本発明のポリペプチド1000  $\mu$ gを静脈内に注入する (細胞とポリペプチドをPBS中で混合し、その0.05 mLを静注する)。対照としてメラノ※

表 2

	投与量 $\mu$ g/マウス	肺への転移数 平均 $\pm$ SD
対 照	-	45 $\pm$ 7
CHV-89	1000	12 $\pm$ 9
CHV-90	1000	11 $\pm$ 5
CHV-179	1000	4 $\pm$ 3

【0033】以上のように、本発明のポリペプチド投与群で、メラノーマの肺転移が抑制されている。

## 【0034】(2) 急性毒性試験

C57BL/6 マウスにCHV-89、CHV-90、CHV-179をそれぞれ静脈内投与した。100 mg/kgにおいて毒性は認められなかった。

## 【0035】実施例5

次に、本発明のポリペプチドの製剤例を示す。なお各例において、部は重量部を意味する。

## 【0036】製剤例1

CHV-89 30部に対しPBSを加え、全量を2000部としてこれを溶解後、ミリポアフィルターGSタイプを用いて除菌ろ過する。このろ液2gを10 mLの

12

※し、同様にメンブランを洗浄した。4-クロロ-1-ナフトール及びH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含む50 mM NaCl-トリス・HC1 (pH 7.5) 溶液にメンブランを浸して、メンブランにブロッキングされたバンドを発色させた。

【0029】以上のようにして得られた測定結果を表1に示す。なお、特開平2-311498号公報記載のC<sub>12</sub>-Met-H<sub>22</sub>を、対照として用いた。

【0030】

【表1】

メラノ細胞のみを静注し、対照群とする。メラノーマ細胞移植後14日目に肺を摘出して、肺表面における転移結節数を實體顕微鏡を用いて測定する。その結果を表2に示す。

【0032】

【表2】

49

バイアル瓶にとり凍結乾燥し、1バイアルに該ポリペプチド30mgを含む凍結乾燥注射剤を得た。

## 【0037】製剤例2

CHV-90 30部に対しPBSを加え、全量を2000部としてこれを溶解後、ミリポアフィルターGSタイプを用いて除菌ろ過する。このろ液2gを10 mLのバイアル瓶にとり凍結乾燥し、1バイアルに該ポリペプチド30mgを含む凍結乾燥注射剤を得た。

## 【0038】製剤例3

CHV-179 30部に対しPBSを加え、全量を2000部としてこれを溶解後、ミリポアフィルターGSタイプを用いて除菌ろ過する。このろ液2gを10 mLのバイアル瓶にとり凍結乾燥し、1バイアルに該ポリペ

(7)

特許2729712

13

ブチド30mgを含む凍結乾燥剤を得た。

【0039】製剤例4

CHV-89 50部、乳糖600部、結晶セルロース330部及びヒドロキシプロピルセルロース20部をよく混和し、ロール型圧縮機（ローラーコンパクター）を用いて圧縮し、破砕して16〜60メッシュの間にふるいに篩過し、顆粒とした。

【0040】製剤例5

CHV-90 50部、乳糖600部、結晶セルロース330部及びヒドロキシプロピルセルロース20部をよく混和し、ロール型圧縮機（ローラーコンパクター）を用いて圧縮し、破砕して16〜60メッシュの間にふるいに篩過し、顆粒とした。

【0041】製剤例6

CHV-179 50部、乳糖600部、結晶セルロース

14

ス330部及びヒドロキシプロピルセルロース20部をよく混和し、ロール型圧縮機（ローラーコンパクター）を用いて圧縮し、破砕して16〜60メッシュの間にふるいに篩過し、顆粒とした。

【0042】

【発明の効果】本発明によりFNのヘパリン結合ドメイン由来のポリペプチド部の構造が異なり、細胞接着活性とガン転移抑制活性の両活性を併せ持つ新規低分子ポリペプチド、並びにそれらをコードする核酸、及びそのDNAを用いる該ポリペプチドの遺伝子工学的な製造方法が提供される。このポリペプチドは遺伝子工学的に大量に供給可能であり、創傷治癒等種々の分野で有用な新規タンパク質である。

【配列表】

19



15

(8)

特許2729712

16

配列番号: 1

配列の長さ: 278

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列:

```

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
  1           5           10          15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
      20           25           30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
      35           40           45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
      50           55           60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Glu
      65           70           75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Glu Lys Thr Gly Leu Asp
      80           85           90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe
      95          100          105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
     110          115          120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
     125          130          135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
     140          145          150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg

```

(9)

特許2729712

17

18

```

155          160          165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
170          175          180
Val Pro Arg Asp Leu Gln Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu
185          190          195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
200          205          210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Phe
215          220          225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
230          235          240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
245          250          255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
260          265          270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met
275

```

配列番号: 2

配列の長さ: 80

配列の型: アミノ酸

鼠の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: 中間部フラグメント (ヒトフィブロネクチン)

配列:

```

Asn Val Ser Pro Pro Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu
1          5          10          15

```

```

Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr

```

(10)

特許2729712

19

20

	20	25	30
Gly Phe Glu Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Glu Thr Pro Ile			
	35	40	45
Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly			
	50	55	60
Leu Glu Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn			
	65	70	75
Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr			
	80	85	

配列番号: 3

配列の長さ: 90

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 1 本鎖

トポロジー: 直線状

配列の覆顔: ペプチド

フラグメント型: 中間部フラグメント (ヒトフィブロネクチン)

配列:

Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro			
1	5	10	15
Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Glu Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr			
	20	25	30
Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu			
	35	40	45
Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr			
	50	55	60
Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu			
	65	70	75
Lys Asn Asn Glu Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr			

7

(11)

特許2729712

21

22

80

85

90

配列番号: 4

配列の長さ: 967

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 1 本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列:

```

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
 1           5           10          15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
          20           25           30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
          35           40           45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Leu Thr Asn Leu Leu
          50           55           60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Glu
          65           70           75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Glu Lys Thr Gly Leu Asp
          80           85           90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe
          95          100          105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
          110          115          120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
          125          130          135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
          140          145          150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg

```

8

(12)

特許2729712

23

24

155	166	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Glu Ser Thr Val Ser Asp		
170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
185	190	185
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Gln Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg		
275	280	285
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp		
290	295	300
Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Glu Val Asn Ala Val		
305	310	315
Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp		
320	325	330
Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr		
335	340	345
Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro		
350	355	360
Val Val Ile Asp Ala Ser Thr		

(13)

特許2729712

25

26

365

配列番号: 5

配列の長さ: 457

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 1 本鎖

トポロジー: 連続状

配列の種類: ペプチド

配列:

```

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
 1           5           10          15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
          20           25           30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Asp Val Ala Glu Leu
          35           40           45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
          50           55           60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Glu
          65           70           75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Glu Lys Thr Gly Leu Asp
          80           85           90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe
          95          100          105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
          110          115          120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
          125          130          135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
          140          145          150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg

```

1 9

(14)

特許2729712

27

28

	155	160	185
Gle Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Glu Glu Ser Thr Val Ser Asp			
	170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu			
	185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg			
	200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Glu Glu Phe			
	215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys			
	230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg			
	245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg			
	260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg			
	275	280	285
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp			
	290	295	300
Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Glu Val Asp Ala Val			
	305	310	315
Pro Ala Asn Gly Glu Thr Pro Ile Glu Arg Thr Ile Lys Pro Asn			
	320	325	330
Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Asp Tyr			
	335	340	345
Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro			
	350	355	360
Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu			

(15)

特許2729712

29

39

```

          385          370          375
Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln
          380          385          380
Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys
          395          400          405
Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly
          410          415          420
Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr
          425          430          435
Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Glu Lys Ser Glu Pro
          440          445          450
Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
          455

```

配列番号: 6

配列の長さ: 383

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 1 単鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: ペプチド

配列:

```

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
1          5          10          15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
20          25          30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
35          40          45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Ile Leu
50          55          60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Glu

```

1 2



(16)

特許2729712

31

32

	65		70		75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu
Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr
Gly	Leu	Asp			
	80		85		90
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp
Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala
Asu	Ser	Phe			
	95		100		105
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala
Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr
Gly	Tyr	Arg			
	110		115		120
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu
His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro
Arg	Glu	Asp			
	125		130		135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg
Asu	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr
Asa	Leu	Thr			
	140		145		150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val
Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala
Leu	Asa	Gly	Arg		
	155		160		165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu
Ile	Gly	Gln	Ser	Thr	Val
Ser	Asp				
	170		175		180
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu
Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro
Thr	Ser	Leu			
	185		190		195
Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Ala
Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg
Tyr	Tyr	Arg			
	200		205		210
Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr
Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val
Gln	Glu	Phe			
	215		220		225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys
Ser	Thr	Ala	Thr	Ile	Ser
Gly	Leu	Lys			
	230		235		240
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr
Ile	Thr	Val	Tyr	Ala	Val
Thr	Gly	Arg			
	245		250		255
Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser
Ser	Lys	Pro	Ile	Ser	His
Asn	Tyr	Arg			
	260		265		270
Thr	Glu	Ile	Asp	Lys	Pro
Ser	Met	Ala	Ile	Asp	Ala
Pro	Ser	Ala			

(17)

特許2729712

33

34

```

          275          280          285
Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp
          290          295          300
Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Gln
          305          310          315
Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Pro Arg Pro Arg Pro
          320          325          330
Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu
          335          340          345
Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu
          350          355          360
Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
          365

```

配列番号: 7

配列の長さ: 26

配列の型: 核酸

鎖の数: 1 本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: 他の核酸 (合成 DNA)

ハイボセティカル配列: 非

アンチセンス: YES

配列の特徴: 1-26 8 primer

配列:

GCTGACATTG GCCATGGCTC CAGAGCT 26

配列番号: 8

配列の長さ: 22

配列の型: 核酸

鎖の数: 1 本鎖

トポロジー: 直線状

14

35

(18)

特許2729712

36

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

ハイボセティカル配列：NO

アンチセンス：YES

配列の特徴：1-22 B primer

配列：

CTATTACACC ATGATGGTT TG 22

配列番号：9

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

ハイボセティカル配列：NO

アンチセンス：YES

配列の特徴：1-22 B primer

配列：

ATCAATGGCC ATGTTGAGG CG 22

配列番号：10

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

ハイボセティカル配列：NO

アンチセンス：YES

配列の特徴：1-30 B primer

配列：

AGCCCGATCC TATTAAGTGG AGCCCTGGAT 30

15

【図面の簡単な説明】

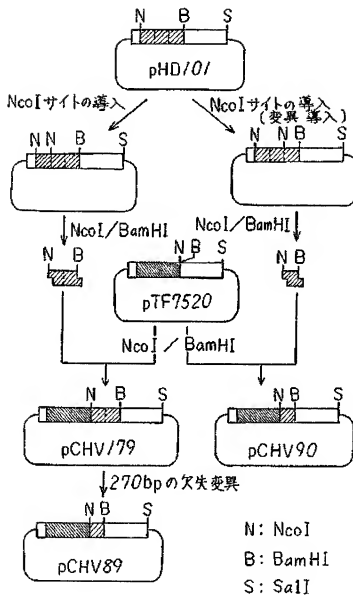
【図1】プラスミドpCMV179、pCMV89、及びpCMV90をそ

れぞれ増殖するための工程図である。

(19)

特許2729712

【図1】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>8</sup>

C12P 21/02

//C12N 1/21

C12R 1:19)

識別記号

序内整理番号

9282-4B

F I

C12N 15/06

技術表示箇所

A

(20)

特許2729712

(C 1 2 P 21/92

C 1 2 R 1:19)

(72)発明者 岩塚 房夫  
 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒  
 造株式会社中央研究所内

(72)発明者 加藤 郁之進  
 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒  
 造株式会社中央研究所内